

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ

Заместитель Министра -

Главный государственный санитарный врач
Республики Беларусь



А.А. Тарасенко

«06» 2022 г.

Регистрационный № 023-1221

**АЛГОРИТМ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ КОКЛЮША,
ПАРАКОКЛЮША И ВИДОСПЕЦИФИЧЕСКОЙ
ДИФФЕРЕНЦИАЦИИ ИХ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ**
инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЕ-РАЗРАБОТЧИК: государственное учреждение
«Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и
микробиологии»

АВТОРЫ:

д.м.н. Колодкина В.Л., н.с. Мартынов В.С.

Минск, 2022

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ

Заместитель Министра -

Главный государственный санитарный врач
Республики Беларусь

А.А. Тарасенко

«10» __ 06 _____ 2022 г.

Регистрационный № 023-1221

**АЛГОРИТМ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ КОКЛЮША,
ПАРАКОКЛЮША И ВИДОСПЕЦИФИЧЕСКОЙ
ДИФФЕРЕНЦИАЦИИ ИХ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ**
инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЕ-РАЗРАБОТЧИК: государственное учреждение
«Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и
микробиологии»

АВТОРЫ:

д.м.н. Колодкина В.Л., н.с. Мартынов В.С.

Минск, 2022

В настоящей инструкции по применению (далее – инструкция) изложены порядок проведения лабораторных исследований при диагностике коклюша, паракоклюша; правила направления клинического материала на исследования; основные методы специфической лабораторной диагностики и критерии оценки их результатов. Описаны особенности видоспецифической дифференциации возбудителей рода *Bordetella*.

Настоящая инструкция предназначена для врачей-педиатров, врачей общей практики, врачей-инфекционистов, врачей-бактериологов, врачей-эпидемиологов, врачей-лаборантов, врачей-лабораторной диагностики, иных врачей-специалистов организаций здравоохранения, оказывающих медицинскую помощь.

ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

Диагностика коклюшной инфекции с проведением видоспецифической дифференциации представителей рода *Bordetella*, вызывающих заболевание у человека, на основе поэтапного подхода.

ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ

Отсутствуют.

ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМЫХ ИЗДЕЛИЙ МЕДИЦИНСКОЙ ТЕХНИКИ И ИЗДЕЛИЙ МЕДИЦИНСКОГО НАЗНАЧЕНИЯ

1. Анализатор иммуноферментный плашечного типа.
2. Тест-система иммуноферментная для выявления специфических иммуноглобулинов класса IgG к коклюшному токсину.
3. Типовая ПЦР-лаборатория.
4. Тест-система для выявления ДНК возбудителей рода *Bordetella*.

ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ

Коклюш – это острое респираторное заболевание, вызываемое грамотрицательной бактерией *Bordetella pertussis*. Типичный коклюш характеризуется тяжелым, продолжительным, спазматическим, приступообразным кашлем, который тяжело протекает и особенно опасен для новорожденных и младенцев, у которых заболевание может заканчиваться смертельным исходом. У привитых детей, подростков и взрослых коклюш, как правило, протекает с менее выраженными симптомами.

Коклюш является инфекцией, управляемой средствами специфической вакцинопрофилактики. Широкое проведение иммунизации против коклюша позволило значительно снизить уровень заболеваемости в сравнении с допрививочным периодом, однако элиминировать инфекцию не удалось. Национальный календарь профилактических прививок в Республике Беларусь предусматривает получение 4-х доз вакцины против коклюша с использованием комбинированных вакцин: первая доза – в 3 месяца (начиная с 11.06.2018 года в 2 месяца), последующие две дозы вводятся с интервалом 1 месяц между введениями, четвертая доза – в 18 месяцев. Поствакцинальный иммунитет обеспечивает защиту от инфекции в течение 5-9 лет, после чего ранее привитые лица становятся восприимчивыми к коклюшу, но переносят заболевание в более легкой форме. Перенесенное заболевание также не формирует пожизненный иммунитет, но защищает от инфекции на более длительный период – 10-15 лет.

Таким образом, заболевание коклюшем может регистрироваться среди лиц всех возрастных групп населения. Однако наибольшему риску подвержены не привитые дети и младенцы первых месяцев

жизни, не успевшие получить первичный курс иммунизации. Основными источниками коклюша для них являются родители и старшие братья/сестры, утратившие поствакцинальный иммунитет.

Постановка диагноза коклюша у привитых детей и взрослых зачастую затруднительна из-за стертой клинической картины заболевания и требует специфической лабораторной диагностики. На сегодняшний день нет одного конкретного метода достаточного для диагностики коклюша. Все используемые современные методы – бактериологические, молекулярно-генетические и серологические – имеют определённые ограничения, и их эффективность существенно зависит от сроков заболевания.

Кроме *B. pertussis* еще три вида из рода *Bordetella* – *B. parapertussis*, *B. bronchiseptica* и *B. holmesii* – могут вызывать респираторные заболевания у человека с симптомами похожими на коклюш. Поэтому диагностика инфекции должна включать возможность видовой дифференциации возбудителя.

ОПИСАНИЕ АЛГОРИТМА ДИАГНОСТИКИ

Показания к лабораторному исследованию

Лабораторные исследования с целью диагностики коклюша проводят по клиническим или эпидемиологическим показаниям:

по клиническим показаниям:

- детям с подозрением на коклюш и коклюшеподобные заболевания;
- детям, кашляющим более 7 дней, независимо от указаний на контакт с больным коклюшем;
- взрослым с подозрением на коклюш и коклюшеподобные заболевания;

по эпидемическим показаниям (лицам, бывшим в контакте с больным):

- детям, общавшимся с больным коклюшем/паракоклюшем в домашних условиях;

- детям, посещающим детские образовательные учреждения, находящимся в детских больницах, санаториях, в которых были выявлены больные коклюшем/паракоклюшем.

- взрослым, при наличии симптомов респираторного заболевания, общавшимся с больным коклюшем/паракоклюшем в домашних условиях, а также работающим в родильных домах, детских больницах, санаториях, детских образовательных учреждениях в т.ч. закрытого типа, при выявлении в них больных коклюшем/паракоклюшем.

Критерии лабораторного подтверждения диагноза

По результатам специфической лабораторной диагностики пациентов с подозрением на коклюш возможно выставление следующих диагнозов:

- коклюш, вызванный *B. pertussis*;
- паракоклюш, вызванный *B. parapertussis*;
- инфекция, вызванная *B. bronchiseptica*;
- инфекция, вызванная *B. holmesii*;
- коклюш неуточненный.

Подтверждением диагноза считается наличие хотя бы одного из ниже перечисленных результатов лабораторных исследований.

Диагноз «коклюш, вызванный *B. pertussis*» выставляется если:

- выделена культура *B. pertussis* бактериологическим методом;
- выявлена ДНК *B. pertussis* методом ПЦР;

- выявлена концентрация IgG к коклюшному токсину (КТ) методом ИФА – 100 МЕ/мл и выше, в случае если от даты последней вакцинации против коклюша прошло больше года;

- выявлена концентрация IgG и/или IgA к КТ методом ИФА – 20 МЕ/мл и выше у не привитых детей;

- наблюдается увеличение или уменьшение в 4 и более раз концентрации IgG и/или IgA к КТ при исследовании парных сывороток, взятых с интервалом не менее 2 недель, методом ИФА;

- выявлен титр антител к *B. pertussis* 1/80 и более в реакции агглютинации (РА) у не привитых детей;

- наблюдается 4-х кратное увеличение титра антител к *B. pertussis* при исследовании парных сывороток, взятых с интервалом не менее 2-х недель, методом РА.

Диагноз «паракоклюш, вызванный *B. parapertussis*» выставляется если:

- выделена культура *B. parapertussis* бактериологическим методом;

- выявлена ДНК *B. parapertussis* методом ПЦР;

- выявлен титр антител к *B. parapertussis* 1/80 и более методом РА у не привитых детей;

- наблюдается 4-х кратное увеличение титра антител к *B. parapertussis* при исследовании парных сывороток, взятых с интервалом не менее 2-х недель, методом РА.

Диагноз «инфекция, вызванная *B. bronchiseptica*» выставляется если:

- выделена культура *B. bronchiseptica* бактериологическим методом;

- выявлена ДНК *B. bronchiseptica* методом ПЦР;

Диагноз «инфекция, вызванная *B. holmesii*» выставляется если:

- выделена культура *B. holmesii* бактериологическим методом;
- выявлена ДНК *B. holmesii* методом ПЦР.

Диагноз «коклюш неуточненный» выставляется если:

- выявлена ДНК возбудителя рода *Bordetella* (*Bordetella spp.*) методом ПЦР без видоспецифической дифференциации.

Выбор методов лабораторной диагностики и взятие материала для исследования на коклюш

При выборе метода лабораторного исследования для подтверждения диагноза коклюш необходимо ориентироваться на сроки от начала заболевания.

1-14 день от начала заболевания:

- носоглоточный мазок на исследование бактериологическим методом с целью выделения культуры возбудителя;
- носоглоточный мазок на исследование методом ПЦР для выявления ДНК возбудителей рода *Bordetella*.

15-21 день от начала заболевания:

- носоглоточный мазок на исследование методом ПЦР для выявления ДНК возбудителей рода *Bordetella*;
- сыворотка крови на исследование методом ИФА для определения концентрации IgG к коклюшному токсину.

22 день и далее:

- сыворотка крови на исследование методом ИФА для определения концентрации IgG к коклюшному токсину.

Для непривитых детей в возрасте до 2 лет взятие носоглоточного мазка для исследования методом ПЦР можно проводить по 30 день от начала заболевания.

Взятие клинического материала

Взятие материала должно проводиться специально выделенным инструктированным персоналом: медицинскими сестрами, лаборантами или врачами в учреждениях здравоохранения или детских учреждениях в отдельно выделенном помещении, исключающем контакт с другими пациентами, или на дому. При взятии материала должна быть полностью исключена возможность взаимного заражения пациентов. Клинический материал для бактериологического и ПЦР исследования забирают натошак или через 2 - 3 часа после еды.

Носоглоточный мазок

Мазки со слизистой носоглотки берут сухим стерильным назофарингеальным тампоном на пластиковом аппликаторе. Зонд вводят легким движением по наружной стенке носа на глубину 2-3 см до нижней раковины, слегка опускают книзу, вводят в нижний носовой ход под нижнюю носовую раковину до носоглотки, делают вращательное движение и удаляют вдоль наружной стенки носа (приложение 2). Общая глубина введения зонда должна составлять примерно половину расстояния от ноздри до ушного отверстия (3-4 см для детей и 5-6 см для взрослых). После взятия материала конец зонда с тампоном опускают в чистую стерильную одноразовую пробирку, или в пробирку с транспортной средой. Верхнюю часть зонда отламывают, пробирку герметично закрывают.

Ротоглоточный мазок

Мазки из ротоглотки берут сухими стерильными зондами из полистирола с вязкими тампонами вращательными движениями с задней стенки ротоглотки, аккуратно прижимая язык пациента шпателем, не касаясь щек, миндалин и языка. После взятия материала рабочую часть зонда с тампоном помещают в чистую стерильную одноразовую пробирку или в пробирку с транспортной средой.

Рукоятку зонда с тампоном опускают вниз и отламывают, придерживая крышкой пробирки с расчетом, чтобы он позволил плотно закрыть пробирку. Пробирку герметично закрывают.

Носоглоточный аспират

Для получения носоглоточного аспирата стерильный узкий катетер вставляется через ноздрю к задней стенке носоглотки. Шприц подсоединяется к другому концу катетера и осуществляется всасывание. Содержимое шприца помещается в стерильную пробирку. Оставшийся на стенках катетера секрет смывается в ту же пробирку фосфатным буфером (приложение 2). Пробирка доставляется в лабораторию не позднее 4-х часов с момента забора.

Сыворотка крови

Проводят взятие крови (для ИФА обязательно натощак) из вены в объеме 3-4 мл или из подушечки третьей фаланги среднего пальца в объеме 0,5-1,0 мл (у детей младшего возраста) в одноразовую пластиковую пробирку без антикоагулянта с соблюдением обычных правил асептики. Пробы крови отстаивают при комнатной температуре в течение 30 мин или помещают в термостат при 37 °С на 15 мин. Затем проводится центрифугирование в течение 5 мин при 3 000 об./мин. По окончании центрифугирования сыворотка переносится в стерильные пробирки.

Хранение и доставка материала

Допускается хранение материала в течение трех суток при температуре 2-8°С, и до одного месяца – при температуре -16°С – -24°С.

Каждая пробирка с биологическим материалом должна быть проверена на герметичность и промаркирована в соответствии с прилагаемым списком. При транспортировке пробирку с биологическим материалом от каждого пациента помещают в индивидуальный

полиэтиленовый пакет подходящего размера с ватой (или другим гигроскопичным материалом) в количестве, достаточном для адсорбции всего образца в случае его утечки, пакет герметично закрывают.

Для исследования бактериологическим методом носоглоточные и ротоглоточные мазки должны сразу после взятия помещаться в пробирки с транспортной средой, содержащей уголь. Замораживание таких образцов не допускается.

При транспортировке и хранении сывороток крови не допускается замораживание-размораживание образцов больше 2 раз.

На клинический материал, направляемый в лабораторию для исследования на коклюш / паракоклюш, должно быть оформлено направление (приложение 3).

Методы выявления и видовой идентификации возбудителей коклюша

Бактериологическая диагностика

Материалом для исследования является слизь из верхних дыхательных путей пациентов с подозрением на коклюш, забор которой осуществляют носоглоточными или ротоглоточными мазками, аспирацией, кашлевыми пластинками.

Метод основан на высеве клинического материала на плотные питательные среды с дальнейшей идентификацией колоний возбудителей рода *Bordetella*.

Бактериологическое исследование с диагностической целью следует проводить в ранние сроки заболевания – не позднее 2-ой недели болезни. Высеваемость возбудителя зависит от следующих факторов: срока обследования, соблюдения правил взятия, транспортировки, посева материала, качества используемых питательных сред. После

полного или частичного курса антибактериальной терапии бактериологическое исследование не эффективно.

Питательные среды

Для выделения бордетелл используются плотные питательные среды: на основе картофельного отвара (среда Борде-Жангу), угольный агар (Regan-Lowe), синтетическая среда на казеиновой основе с добавлением угля – казеиново-угольный агар (КУА), обогащенные глицерином, пептоном и кровью. Оптимально добавлять в среды лошадиную, баранью или кроличью кровь, использование человеческой крови дает худшие результаты. К среде Regan-Lowe возможно добавление вместо крови или в дополнение к ней сыворотки крупного рогатого скота (5%) и среды № 199 (1%). Приготовление сред осуществляется согласно инструкции производителя.

Для ингибирования посторонней микрофлоры используют цефалексин (20-40 мг/л среды). Оценивать достаточность цефалексина правильнее по результатам количественного контроля используемой серии питательного агара. В отличие от пенициллина цефалексин не подавляет рост *B. pertussis* и более эффективен в отношении сопутствующей микрофлоры. Расплавленный агар заливают на чашки Петри слоем толщиной не менее 4 мм.

Инкубация осуществляется при температуре 35-37°C без добавления CO₂ в условиях повышенной влажности.

Методика бактериологического исследования.

Длительность бактериологического исследования составляет 5-7 дней:

Первый день – прямой посев на плотную среду содержащую антибиотик.

Второй-четвертый день – просмотр колоний визуально и с помощью микроскопа бинокулярного стереоскопического (МБС) для морфологической характеристики и отбора подозрительных колоний.

На указанных средах бордетеллы вырастают в виде характерных колоний: на среде Борде-Жангу – выпуклые, гладкие, блестящие, серебряного цвета, напоминающие капли ртути, окруженные зоной гемолиза; на КУА – выпуклые, гладкие, серого цвета, с жемчужным, желтоватым или беловатым оттенком. Колонии маслянистые, легко снимаются петлей. *B. parapertussis* и *B. holmesii* за счет образования пигмента вызывают потемнение сред с кровью, образуют бурую подложку.

При стереоскопической микроскопии можно наблюдать узкий луч света (хвостик), отходящий от центра колонии. Колонии *B. parapertussis* очень похожи на *B. pertussis*, но серее и менее выпуклы. *B. bronchiseptica* может образовывать колонии аналогичные *B. pertussis*, а также более плоские с приподнятым центром.

Сроки выявления колоний различны: колонии *B. bronchiseptica* появляются через 18-24 часа, *B. parapertussis* – через 24-48 часов, *B. pertussis* – через 48-72 часа. Различная скорость роста отражается на величине колоний при просмотре их через 72 часа.

Рост *B. pertussis* и *B. bronchiseptica* на питательной среде не сопровождается изменением ее цвета. *B. parapertussis* при обильном росте на среде КУА вызывают диффузное окрашивание среды в буровато-коричневый цвет, что выявляется при просмотре в проходящем свете, а также вызывают потемнение среды с кровью (за счет активности тирозиназы).

При наличии на среде выращивания подозрительных колоний производят выделение чистой культуры, путем отсева их на скошенный

КУА или в чашки Петри с одной из питательных сред. При этом поверхность среды делят на несколько секторов и отсевают каждую колонию на отдельный сектор, тщательно втирая ее в среду круговыми движениями.

При наличии значительного количества однотипных подозрительных колоний после выделения чистой культуры, из оставшихся колоний делают мазки в физиологическом растворе, определяют морфологию культуры при окраске по Граму. Одновременно определяют также отсутствие спонтанной агглютинации. Микробы рода *Bordetella* имеют вид мономорфных мелких овоидных палочек (коккобактерий), равномерно располагаются в мазке, грамотрицательны. Иногда *B. parapertussis*, особенно на среде Борде-Жангу, могут иметь вид удлинённых полиморфных палочек.

Культуру из оставшихся колоний проверяют в реакции агглютинации на стекле со специфическими видовыми неадсорбированными сыворотками, разведенными 1:10 и по возможности с адсорбированными монорецепторными сыворотками к агглютиногенам (факторам) 1 и 14. Если число подозрительных колоний значительно, то возможна постановка пробы Заксе для определения наличия фермента уреазы.

На основании изучения характера колоний и морфологии в мазках, окрашенных по Граму, положительной реакции агглютинации с видовыми неадсорбированными и адсорбированными сыворотками к факторам 1 и 14 на третьи сутки можно выдать предварительный ответ.

При отсутствии роста подозрительных колоний на питательных средах чашки Петри вновь помещают в термостат и повторно просматривают на наличие колоний на 24-48 часов.

На пятый-седьмой день – просматривают посевы, произведенные для выделения чистой культуры, и отмечают изменения цвета среды: *B. parapertussis* диффузно окрашивают среду выращивания (КУА) в буровато-коричневый цвет.

На предметном стекле в капле физиологического раствора готовят мазки и окрашивают их по Граму, определяя морфологию выделенной культуры, ее чистоту, а также отсутствие спонтанной агглютинации.

Подготовка клинического материала и выделение ДНК для исследования в ПЦР

В пробирки с сухими мазками добавляют по 0,4 мл стерильной дистиллированной воды, мазки, транспортированные в плотной среде, предварительно переносят в чистые пробирки. Тщательно встряхивают и центрифугируют 20°С при 3000-5000 об/мин, извлекают зонды. Полученные смывы используют для выделения ДНК.

Выделение ДНК осуществляется коммерческими наборами согласно инструкции производителя. Для некоторых ПЦР наборов допускается экстракция ДНК путем термического лизиса – 50 мкл образца переносят в отдельную пробирку и инкубируют 15 минут при 95°С, после чего центрифугируют 5 минут при 3000-5000 об/мин. Однако эффективность ПЦР при использовании такого метода выделения ДНК снижается.

Проведение ПЦР, характеристика специфических мишеней

Для проведения ПЦР диагностики необходимо использование зарегистрированных наборов реагентов (тест-систем), предназначенных для выявления ДНК возбудителей рода *Bordetella* в клиническом материале. Порядок проведения ПЦР-исследования и интерпретация результатов анализа должны выполняться строго в соответствии с инструкцией изготовителя набора реагентов.

В наборах разных производителей в качестве генов-мишеней могут выступать различные специфические участки геномов рода *Bordetella*. Наиболее часто используемыми мишенями являются повторяющаяся инсерционная последовательность *IS481* и промоторная область гена токсигенности *ptx* для *B. pertussis* и повторяющаяся инсерционная последовательность *IS1001* для *B. parapertussis*. Однако сегодня отсутствует единая универсальная мишень для ПЦР, которая считалась бы «золотым стандартом» для диагностики коклюша. Мишени *IS481* и *IS1001* являются мультикопийными, что обеспечивает их высокую эффективность и выявление даже очень малого количества ДНК в клиническом образце. При этом *IS481* присутствует в геномах трех возбудителей рода – *Bordetella pertussis*, *Bordetella bronchiseptica*, *Bordetella holmesii*, – что не позволяет обеспечить видовую дифференциацию при положительном результате только на эту мишень. Такие пробы обозначаются как положительные в отношении обнаружения ДНК *Bordetella spp.* и требуют дополнительных исследований. В связи с чем, при проведении лабораторной диагностики рекомендуется использовать наборы реагентов, которые обеспечивают выявление ДНК *B. pertussis* за счет детекции дополнительной видоспецифической мишени.

Серологическая диагностика

Серологическая диагностика основана на обнаружении специфических антител в сыворотке крови, которые вырабатываются в ответ на коклюшную инфекцию. В отличие от многих других инфекций обнаружение IgM к коклюшным антигенам не является диагностически значимым показателем, так как они обладают низкой специфичностью. Поэтому серологические методы основаны либо на подтверждении нарастания титров антител в парных сыворотках, либо на выявлении

высокой концентрации специфических IgG в одной сыворотке на поздних стадиях заболевания.

Диагностически значимыми считаются IgG к коклюшному токсину (КТ), так как они обладают высокой специфичностью, и их концентрация в крови быстро падает как после вакцинации, так и после перенесенной инфекции. Валидация коммерческих наборов относительно стандартных сывороток и определение концентрации в международных единицах позволило определить пороговый уровень IgG к КТ свидетельствующий о недавно перенесенной инфекции коклюша – 100 международных единиц в миллилитре (МЕ/мл), в том числе для привитых пациентов, если срок от последней вакцинации против коклюша составляет больше года.

Однако IgG к КТ вырабатываются на поздних этапах заболевания, что ограничивает эффективность использования серологических методов в первые две недели заболевания.

Иммуноферментный анализ

Для проведения иммуноферментного анализа (ИФА) требуется использование коммерческих наборов реагентов, предназначенных для выявления IgG только к коклюшному токсину. Интерпретация результатов анализа должна выдаваться в МЕ/мл, диапазон измерений от 5 МЕ/мл до 150 МЕ/мл и выше.

Не рекомендуется использовать коммерческие ИФА наборы, которые выявляют антитела к другим антигенам бактерии, либо используют всю клетку *B. pertussis* в качестве антигена. Так как такие наборы имеют высокий уровень ложноположительных результатов.

Тестирование IgM также не рекомендуется, и обнаружение положительных титров IgM к коклюшу не является лабораторным подтверждением диагноза.

При обследовании пациентов на IgG к коклюшному токсину в ИФА следует руководствоваться сроками от начала заболевания, для адекватной оценки результатов исследования.

При оценке результатов по одной сыворотке, необходимо, чтобы она была взята не ранее чем 21 день от появления первых симптомов.

Концентрация IgG к КТ выше >100 МЕ/мл свидетельствует о коклюшной инфекции.

Концентрация IgG к КТ ниже <100 МЕ/мл свидетельствует об отсутствии недавней инфекции. При этом концентрация IgG к КТ в пределах 60-100 МЕ/мл может говорить о перенесенной инфекции в течение последнего года, но не является лабораторным подтверждением диагноза.

В случае если сыворотка крови взята на 1-20 день от начала заболевания, а концентрация IgG к КТ ниже <100 МЕ/мл это не является свидетельством отсутствия недавней инфекции и требует взятия повторной сыворотки через две недели для исследования динамики концентрации антител.

Если во второй сыворотке крови есть 4-х кратное нарастание концентрации IgG к КТ, либо значение во второй сыворотке выше 100 МЕ/мл, это свидетельствует о коклюшной инфекции.

Если во второй сыворотке крови нет 4-х кратного нарастания концентрации IgG к КТ, и вторая сыворотка ниже 100 МЕ/мл, это указывает на отсутствие инфекции.

Для не привитых детей концентрация IgG к КТ выше 20 МЕ/мл в сыворотке крови свидетельствует о коклюшной инфекции.

Реакция агглютинации

Реакция агглютинации основана на связывании специфических антител (агглютининов) с целыми бактериальными клетками

возбудителя коклюша. Однако этот метод не позволяет дифференцировать прививочные антитела от инфекционных, из-за чего требует проведения исследований только в парных сыворотках крови. При этом первая сыворотка должна быть взята в первые 14 дней от начала заболевания, а вторая еще через две недели. В таком случае 4-х кратное нарастание титров антител будет свидетельствовать о коклюшной инфекции. Только у не привитых детей титр антител 1:80 при однократном исследовании сыворотки крови подтверждает наличие коклюшной инфекции.

*Выявление *B. bronchiseptica* и *B. holmesii* методом ПЦР*

Поскольку во многих коммерческих наборах для выявления ДНК *Bordetella pertussis* используется мишень IS481, которая не обеспечивает видовой дифференциации возбудителей рода *Bordetella*, необходимо проведение дополнительных исследований образцов положительных только на эту мишень. Для этого могут быть использованы ПЦР, направленные на специфические гены-мишени *flaA* и *hIS1001*, обеспечивающие выявление ДНК *B. bronchiseptica* и *B. holmesii* соответственно.

*ПЦР для выявления ДНК *B. bronchiseptica**

Для исследования клинического материала на наличие ДНК *B. bronchiseptica* используется TaqMan ПЦР, направленная на выявление фрагмента гена *flaA* длиной 97 н.п. с использованием специфических праймеров и зонда (таблица 1). Состав реакционной смеси и режим амплификации приведены в таблицах 2 и 3 соответственно.

Таблица 1 – Олигонуклеотидная последовательность праймеров и зонда

Название праймера	Последовательность, 5' - 3'
Прямой праймер	CGCAGGAACATGCCCTTTGCCGC
Обратный праймер	TTGCCTGGATTACGGCAGGTT
Зонд	FAM-CCGCACATTTCCGAACCTTCACTT-BHQ1

Таблица 2 – Состав реакционной смеси

Реагенты	Количество на 1 реакцию (мкл)	Конечная концентрация
x10 ПЦР буфер	2,5 мкл	x1
MgCl ₂ (25 мМ)	2 мкл	2 мМ
ДМСО (25%)	1 мкл	1%
Смесь dNTP (10 мМ каждого dATP, dCTP, dGTP и dTTP)	0,5 мкл	200 мкМ каждого dNTP
Taq-полимераза (5 ед/мкл)	0,4 мкл	1,25 ед
Смесь праймеров и зонда x25	1 мкл	x1
Прямой праймер (5мкМ)		200 нМ
Обратный праймер (5мкМ)		200 нМ
Зонд (5мкМ)		200 нМ
H ₂ O	12,6 мкл	
Общий объем	20 мкл	
Добавить 5 мкл ДНК в каждую пробирку (конечный объем 25 мкл)		

Таблица 3 – Условия амплификации

Число циклов	Рабочая температура (С°)	Стадия ПЦР
1 цикл	95°С 5 минут	Преденатурация
45 циклов	95°С 10 секунд 60°С 1 минута	Денатурация Элонгация

Детекция флуоресценции на стадии элонгации. Образцы со значениями *C_t* равными 42,0 и более учитываются как негативные.

ПЦР для выявления ДНК V. holmesii

Для исследования клинического материала на наличие ДНК *V. holmesii* в клиническом материале используется TaqMan ПЦР, направленная на выявление гена-мишени *hIS1001*. Фрагмент гена

hIS1001 длиной 92 н.п. амплифицируется с использованием набора праймеров и зонда приведенных в таблице 4.

Таблица 4 – Олигонуклеотидная последовательность праймеров и зонда

Название праймера	Последовательность, 5' - 3'
Прямой праймер	TTGAGCTCATCGCGCATCAGATA
Обратный праймер	AACCTCGATCCGTGCCAATCGGA
Зонд	FAM-TTGGCCTGGAGCAACTCGTCCAA-BHQ1

Постановка реакции аналогична ПЦР на *B. bronchiseptica* (таблицы 2 и 3).

Видоспецифическая дифференциация возбудителей рода *Bordetella* имеет большое значение для определения реальной заболеваемости коклюшем, установления распространенности других микроорганизмов, вовлеченных в заболеваемость с коклюшеподобными симптомами, и оценки их вклада в эпидемиологию коклюша, для использования в лечении адекватных противомикробных лекарственных средств, и для оценки эффективности вакцины против коклюша.

ПЕРЕЧЕНЬ ВОЗМОЖНЫХ ОШИБОК ПРИ ДИАГНОСТИКЕ КОКЛЮШНОЙ ИНФЕКЦИИ И ПУТИ ИХ УСТРАНЕНИЯ

Возможные ошибки при постановке ПЦР

Проведение молекулярно-генетических исследований подразумевает соблюдение правил на всех этапах работы: взятие биологического материала, транспортирование, пробоподготовка и хранение; выделение нуклеиновых кислот, амплификация и детекция. Несоблюдение данных правил приводит к возникновению ошибок, которые становятся причиной ложноположительных и ложноотрицательных результатов, что в свою очередь приводит к неверной интерпретации результатов.

Причины ложноположительных результатов: использование ПЦР наборов, которые не обеспечивают видовую дифференциацию представителей рода *Bordetella*, перекрестная контаминация от образца к образцу в процессе предварительной обработки.

Причины ложноотрицательных результатов: не соблюдение оптимальных сроков забора носоглоточных мазков от начала заболевания, деградация исследуемой ДНК, наличие ингибиторов ПЦР.

Пути устранения: забор носоглоточных мазков проводить в сроки оптимальные для ПЦР, как указано в инструкции выше, использовать ПЦР наборы, обеспечивающие дифференциацию представителей рода *Bordetella*, повторное выделение ДНК, использование на всех этапах исследования одноразовой стерильной посуды и наконечников.

Возможные ошибки при постановке ИФА

Причины ложноположительных результатов: использование тест систем на обнаружение IgM к коклюшным антигенам и обнаружение IgG не коклюшному токсину, а другим антигенам бактерии.

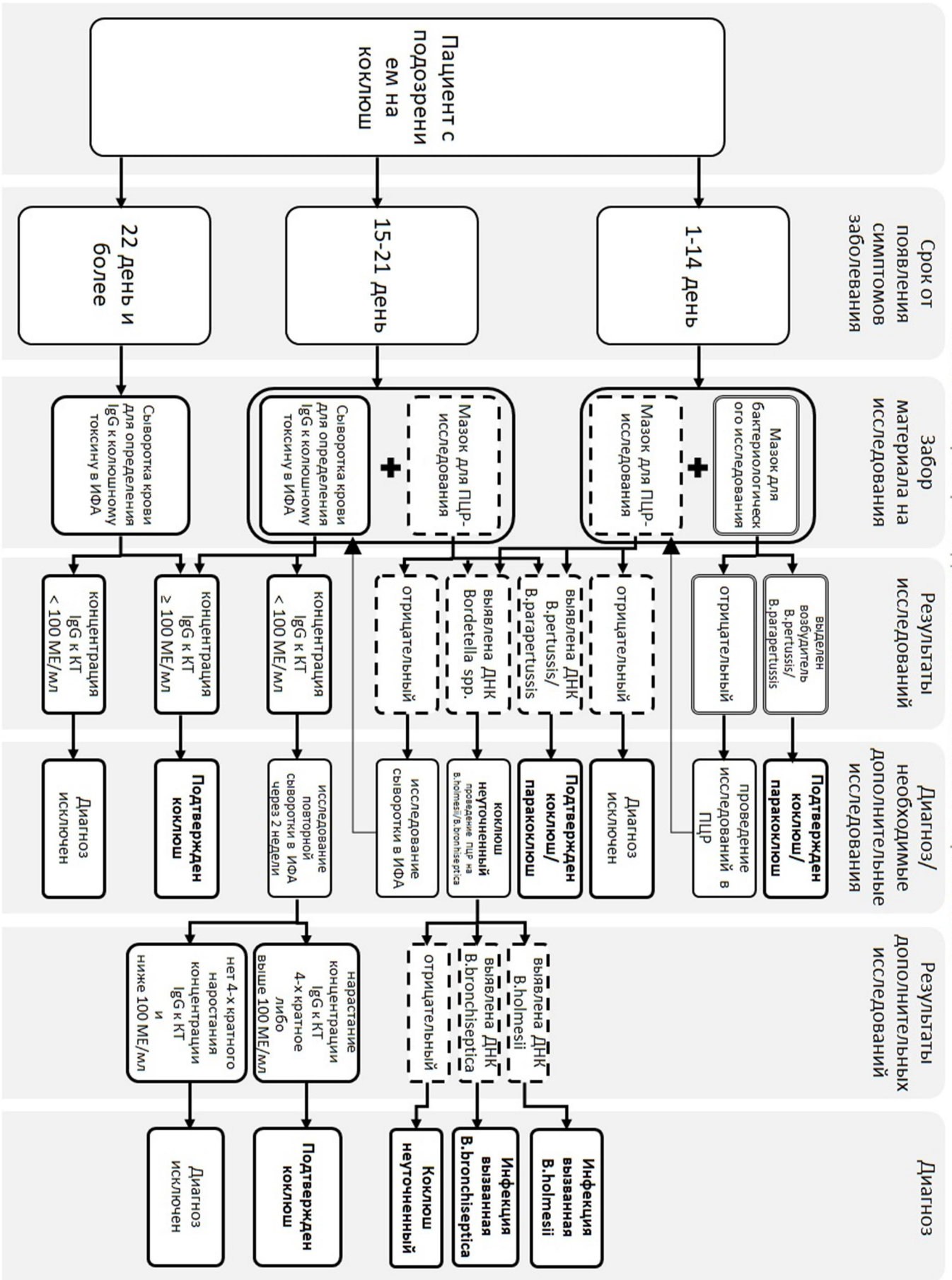
Причины ложноотрицательных результатов: забор сыворотки крови в первые дни (1- 20) от начала заболевания. Полученный результат концентрации IgG к КТ ниже <100 МЕ/мл не является свидетельством отсутствия недавней инфекции и требует взятия повторной сыворотки через две недели для исследования динамики концентрации антител.

Пути устранения: строгое соблюдение алгоритма выполнения серологических тестов согласно вышеуказанной инструкции.

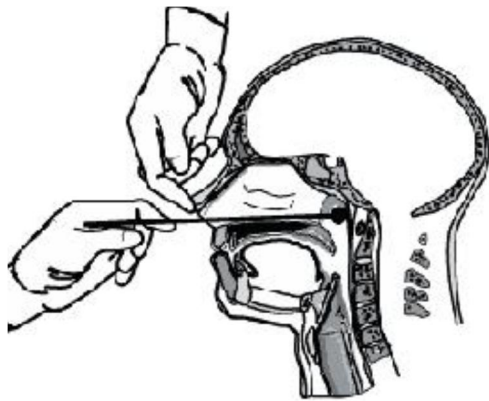
Приложение 1

Схема лабораторной диагностики коклюша и паракоклюша

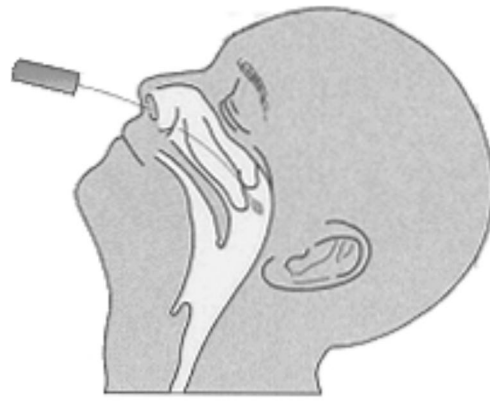
Схема лабораторной диагностики коклюша и паракоклюша



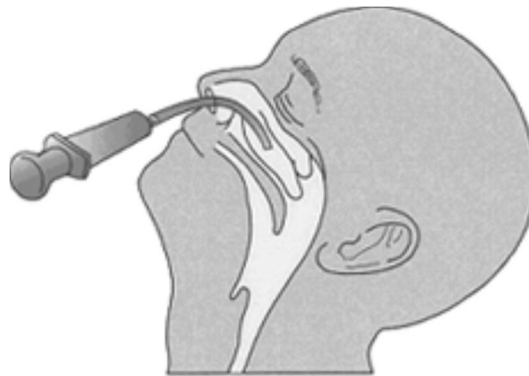
Приложение 2
Техника забора материала из носоглотки



а



б



в

а, б – варианты забора носоглоточного мазка
в – забор носоглоточного аспирата

Приложение 3

Направление на клинический материал, направляемый в лабораторию для исследования на коклюш/паракоклюш, с необходимой информацией:

- наименование учреждения, направившего материал для исследования, отделение;
- ФИО пациента или контактного лица полностью
- возраст (дата, месяц и год рождения)
- домашний адрес пациента или контактного лица,
- дата заболевания,
- дата обращения в поликлинику,
- дата госпитализации,
- дата взятия материала
- первичный диагноз
- прививочный статус пациента (наименование вакцины и дата полученных всех доз вакцины, содержащей коклюшный компонент)

Забор клинического материала проводить в соответствии с оптимальным временем для диагностических тестов:

- кашель/симптомы меньше 3 недель: ПЦР + бактериология
- кашель 3-4 недели: ПЦР + серология (ИФА IgG к коклюшному токсину)
- кашель больше 4 недель: только серология (ИФА IgG к коклюшному токсину)

Указать телефон/факс по которому направлять ответы лабораторных исследований.